Paris 1972

UNIVERSITÉ RENÉ DESCARTES
FACULTÉ DE MÉDECINE NECKER-ENFANTS MALADES

54

ANNÉE 1972 N°

THÈSE

pour le

DOCTORAT EN MÉDECINE

(Diplôme d'État)

par

Jérôme COUTURIER

né à Neuilly le 27 Février 1947

Présentée et soutenue publiquement le 1972

ETUDE D'UNE TECHNIQUE DE MARQUAGE DES CHROMOSOMES HUMAINS PAR ACTION D'ENZYMES PROTEOLYTIQUES

Président : M. Jérôme LEJEUNE, Professeur

UNIVERSITÉ RENÉ DESCARTES
FACULTÉ DE MÉDECINE NECKER-ENFANTS MALADES

ANNÉE 1972 N°.....

THÈSE

pour le

DOCTORAT EN MÉDECINE

(Diplôme d'État)

par

Jérôme COUTURIER

né à Neuilly le 27 Février 1947

Présentée et soutenue publiquement le.....1972

ETUDE D'UNE TECHNIQUE DE MARQUAGE DES CHROMOSOMES HUMAINS PAR ACTION D'ENZYMES PROTEOLYTIQUES

Président : M. Jérôme LEJEUNE, Professeur

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A la Mémoire de mon Père

A ma Mère

En témoignage de reconnaissance pour tous les sacrifices qu'ils ont du consentir.

A ma famille

A tous ceux que j'aime

A Monsieur le Professeur Jérôme LEJEUNE

Professeur de Génétique Fondamentale

qui m'a enseigné la Cytogénétique ,
qui a bien voulu accepter le sujet de ce travail

En témoignage de ma respectueuse admiration
et de ma reconnaissance pour m'avoir accueilli
dans son laboratoire.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549219_0030

A Monsieur le Docteur Bernard DUTRILLAUX
Chargé de Recherches au C.N.R.S.

qui a guidé mes débuts en Cytogénétique

En remerciement de son aide constante et de son amicale sollicitude à mon égard, au cours de ce travail.

Aux Docteurs

Marie-Odile RETHORE
Maitre de Recherches à l'INSERM

Marguerite PRIEUR

Odile RAOUL

Pierre-Marie SINET

En remerciement de la sympathie qu'ils m'ont témoignéeà mon arrivée dans le laboratoire.

Aux techniciennes des laboratoires des Enfants Malades

et de l'Institut de Progénèse

A Madame DALLO

Madame LENNE

En reconnaissance de l'aide qu'elles m'ont apportée dans la réalisation de ce travail.

A mes Maîtres d'Externat :

M. le Professeur Lucien LEGER
M. le Docteur Jacques HEPP
M. le Professeur Charles DUBOST
M. le Professeur Jean HAMBURGER
M. le Professeur Raymond BASTIN
M. le Professeur Paul CASTAIGNE
M. le Professeur Emile HERVET
M. le Professeur Jean FREZAL

INTRODUCTION

I - TRAVAUX ANTERIEURS

II - MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE ENZYMATIQUE

1 - Analyse des modifications chromosomiques sous l'effet du traitement.

2 - Mise au point de la technique de marquage = Protéase

3 - Analyse de l'action d'autres enzymes

a) Trypsine , α-chymotrypsine

b) Pepsine

c) Papaïne

d) Leucine-amino-peptidase

4 - Comparaison. Interprétation des résultats obtenus par l'action des différents enzymes

III - COMPARAISON AVEC LES AUTRES TECHNIQUES DE MARQUAGE CHROMOSOMIQUE

1 - Les différentes techniques

2 - Technique enzymatique

3 - Nomenclature internationale

IV - DESCRIPTION DU CARYOTYPE OBTENU PAR TECHNIQUE ENZYMATIQUE

V - APPLICATION A LA PATHOLOGIE CHROMOSOMIQUE

1 - Etude d'une lacune du chromosome 2 (2qh)

2 - Etude de quelques cas de translocation

VI - INTERET THEORIQUE DE LA METHODE

CONCLUSION

- - - - - - - - - - -

INTRODUCTION

Les méthodes classiques d'analyse du caryotype humain ont ouvert un champ nouveau de la pathologie ; cependant, du fait de la coloration homogène des chromosomes et de la grande ressemblance de certains d'entre eux, de nombreuses imprécisions subsistaient.

En 1970, CASPERSSON et coll. (3) (4) montrèrent que, colorés avec des dérivés de la Quinacrine et observés en lumière ultra-violette, les chromosomes humains étaient constitués de la succession de zones plus ou moins fluorescentes ; la répartition de ces zones sur chaque chromatide permettait de reconnaitre sans ambiguité chacun des éléments du caryotype.

Peu après, en 1971, sont apparues de nouvelles et nombreuses techniques d'application pratique beaucoup plus aisée , dont la première a été mise au point par DUTRILLAUX et LEJEUNE , 1971 . Ces différentes méthodes font appel à des réactions de principes apparemment différents.

Dans ce travail , une technique par digestion enzymatique protéolytique a été plus particulièrement expérimentée. Afin d'apprécier la valeur de cette méthode, ses résultats sont comparés à ceux obtenus par d'autres techniques, tant dans l'analyse de cellules normales que dans celle de cellules porteuses de translocation ou d'autres anomalies structurales.

Enfin, l'analyse et la comparaison des résultats apportés par ces méthodes permettent de tenter une interprétation de leur mécanisme d'action, ce qui pourrait contribuer à mieux connaitre la structure fine des chromosomes.

I - TRAVAUX ANTERIEURS

Après les découvertes des techniques de marquage chromosomique, de nombreuses expériences ont été faites afin de préciser le mécanisme de ces phénomènes. On a aussi étudié l'action de divers agents susceptibles de modifier sélectivement certaines structures chromosomiques. L'un de ces essais, faisant intervenir une digestion des préparations chromosomiques par des enzymes protéolytiques s'est rapidement révélé du plus haut intérêt puisqu'il a permis la mise au point d'une nouvelle méthode d'analyse du caryotype.

La pronase, enzyme protéolytique non spécifique a été la première employée.

Ses effets éventuels pouvaient être étudiés , à priori, soit sur des cellules vivantes, soit sur des préparations chromosomiques fixées.

L'essai sur des cellules vivantes, cité par AL-AISH (1), avait seulement permis de conslure qu'elle avait effectivement une action sur les chromosomes de telles cellules, ne manifestant pas une digestion progressive sans caractères particuliers et ayant pour résultat une disparition totale des figures mitotiques.

Indépendamment, DUTRILLAUX, de GROUCHY, FINAZ et LEJEUNE ont utilisé la pronase mais en la faisant agir sur des préparations fixées et non sur des cellules vivantes (7) .

II - MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE DE DIGESTION ENZYMATIQUE

Bien que l'intérêt de ces techniques par action d'enzymes protéolytiques soit essentiellement théorique puisqu'elles ont, les premières montré que le marquage chromosomique dépendait en partie au moins de composants protéïques, leur application pratique n'en est pas moins appréciable. Aussi, devant le manque de fidélité des résultats obtenus par ces techniques nous avons tenté de préciser les conditions expérimentales de leur meilleure efficacité.

1 - Analyse des modifications chromosomiques sous l'effet du traitement.

Nos premiers essais ont porté sur un enzyme protéolytique non spécifique = la Protéase de type I avec laquelle a été établi un protocole qui sera repris ensuite, en l'adaptant, pour l'étude d'autres enzymes.

Avant d'étudier plus particulièrement les conditions d'obtentio du marquage, nous avons analysé les aspects cytologique du processus de digestion.

Le déroulement de l'action enzymatique est suivi sur les préparations non colorées, par l'observation au microscope en contraste de phase avec un objectif x 16. Les aspects observés sont ensuite précisés par coloration.

En observation en contraste de phase, on note, au début, un gonflement des chromosomes d'abord homogène, puis hétérogène =

Les préparations chromosomiques, obtenues selon les techniques habituelles (21) (12) sont plongées 3 à 6 minutes dans une solution aqueuse contenant 5 mg de pronase pour 100 ml et maintenue à 37°. Après lavage et séchage, les lames sont colorées par le colorant de Giemsa.

Les images obtenues sont assez variables d'une cellule à l'autre mais permettent de préciser les points suivants :

- les chromosomes apparaissent gonflés,
- les chromatides de chaque chromosome révèlent une succession de zones claires et de zones sombres selon des séquences identiques pour des régions homologues des chromosomes.

Les zones sombres apparaissent comme des constrictions par rapport aux zones claires, plus gonflées.

- la séquence des bandes claires et sombres est caractéristique de chaque paire chromosomique et permet un classement sans ambiguité du caryotype.

A ce moment, des expériences utilisant d'autres enzymes protéolytiques (Trypsine et α-chymotrypsine) avaient laissé prévoir des résultats comparables.

Peu après, SEABRIGHT (18) (19) publiait une autre technique enzymatique, utilisant la trypsine.

Le traitement pour l'obtention des préparations diffère légèrement de celui employé par DUTRILLAUX et coll., essentiellement par le milieu utilisé pour le choc hypotonique qui est ici composé de KCl 0,075 M.

La solution enzymatique est constituée d'une ampoule de Bacto Trypsine Difco dissoute dans 100 ml de sérum salé isotonique et maintenue à la température ordinaire.

Les lames sont recouvertes de cette solution pendant 10 à 15 secondes et rincées au sérum salé isotonique.

Elles sont ensuite colorées au colorant de Leishman.

Les images obtenues sont exactement comparables à celles données par la pronase.

FINAZ et GROUCHY , estimant que l'emploi d' α-chymotrypsine permettait l'obtention d'images plus fines que celles obtenues après l'action de la pronase, ont ensuite rapporté une technique comparable utilisant cette enzyme (10).

- - - - - - - - - -

certaines zones apparaissent très gonflées, séparées entre elles par des points de striction apparente. C'est à ce stade que le marquage le plus net est obtenu après coloration. Il est remarquable que cette action soit plus précoce au niveau des mitoses les moins éclatées ou de celles qui sont enserrées dans des amas cellulaires, que sur les chromosomes isolés. Si l'on poursuit la lyse, les chromosomes perdent toute structure : leurs contours deviennent flous et leur substance parait se répandre sur le fond de la préparation; la mitose n'a plus que l'aspect d'une tache amorphe.

Si l'on colore des préparations à ces différents stades, on observe que les chromosomes prennent d'abord un aspect "empâté" tout en restant encore de coloration homogène. Puis, certaines zones des chromatides prennent moins bien le colorant à mesure qu'elles gonflent, formant ainsi des sortes de bulles claires; celles-ci sont séparées entre elles par des zones peu gonflées, normalement colorées, donnant l'aspect de bandes sombres. A ce stade, le marquage chromosomique est le plus net.

Une action enzymatique plus prolongée pourra éventuellement permettre le gonflement secondaire d'une bande sombre qui apparaitra alors dédoublée en deux bandes plus fines de part et d'autre d'une bulle claire.

Si l'on laisse se poursuivre l'action enzymatique, les structures se modifient profondément : Les chromosomes perdent leurs contours, et leur substance, faiblement colorée, parait se répandre largement autour d'eux; les zones colorées correspondant aux anciennes bandes sombres diffusent elles aussi de part et d'autre des chromatides.

Ainsi, l'emplacement de la mitose apparait alors comme une masse presque amorphe où se détachent cependant, par leur coloration, les régions des centromères et des résidus de bandes sombres. Cet aspect persiste pour des temps de contact avec l'enzyme très prolongés.

La sensibilité des chromosomes à l'action protéolytique semble d'autant plus grande que les préparations sont plus récentes et cette sensibilité peut être telle que les chromosomes sont lysés en des temps très courts. Inversement, des préparations trop anciennes donnent de mauvais résultats : les chromosomes sont progressivement lysés sans passage par des stades de gonflement et de marquage. Dans d'autres cas, toute la substance chromosomique se résout en une bulle englobant la totalité de chaque bras chromosomique. Après élimination de cette bulle, ne persiste à l'emplacement du chromosome qu'une image pâle et floue. Ces observations suggèrent que l'hydratation des préparations pourrait jouer un rôle important dans l'obtention d'un marquage satisfaisant.

2 - Mise au point technique

Cette étude des aspects évolutifs de l'attaque protéolytique des chromosomes nous a permis de déterminer à quel stade était obtenu le marquage. Nous avons ensuite essayé de codifier la méthode afin d'améliorer la fidélité et la qualité des résultats.

Essentiellement, nous avons fait agir l'enzyme en milieu tamponné au pH optimum d'action de celle-ci et à température convenable.

La solution enzymatique est composée ainsi :

- Protéase type I lyophilisée (Sigma) : 5mg
- Eau bidistillée 92 ml
- Solution de tampon phosphate 8 ml

La solution de tampon phosphate est constituée de

- $Na_2 HPO_4$, $2 H_2O$ en solution aqueuse = 80,8 ml
  à raison de 11,876 g par l
- $KH_2 PO_4$ à raison de 9,078 g/l = 19,2 ml

solution tampon = 100 ml

La solution enzymatique finale a ainsi un pH voisin de 7,5 . Elle est maintenue à la température ordinaire (20° environ).

Les meilleurs résultats sont obtenus avec des préparations datant de 8 à 10 jours.

Les lames fixées sont plongées 20 secondes dans la solution enzymatique tamponnée, puis retirées et rincées à l'eau courante, enfin séchées à l'air chaud. On observe ensuite au microscope, à sec, en contraste de phase , avec objectif x 16.

Si l'action enzymatique parait avoir été suffisante, les lames sont alors directement colorées au colorant de Giemsa. Sinon, les lames sont replongées dans la solution pour une nouvelle période de 20 secondes et traitées ensuite comme précédemment. Dans ces conditions les temps de contact nécessaires avec l'enzyme dépassent rarement 1 minute et demie. Cette action en milieu tamponné augmente la reproductibilité des résultats. La qualité du marquage est meilleure à la température ordinaire; en effet à 37°, l'action est fréquemment très brutale, entraînant rapidement des altérations importantes des chromosomes avant même l'apparition d'un marquage. Au contraire , à basse température (4° par exemple) l'action enzymatique n'est plus suffisamment incisive et détruit les chromosomes lentement de façon homogène . L'observation en contraste de phase avant coloration

résout les difficultés posées par les variations de sensibilité d'une préparation à l'autre.

Pour obtenir le meilleur contraste du marquage nous avons été amené à modifier le temps de coloration et la concentration de colorant, de façon que seules les zones les plus chromophiles soient colorées. Les chromosomes ainsi faiblement colorés peuvent être photographiés en contraste de phase. Nous avons été ainsi amené à colorer 5' dans une solution de Giemsa à 3%.

Le marquage obtenu est indentique à celui produit par la Pronase, la Trypsine et l'α-chymotrypsine :

- Tous les chromosomes sont gonflés en des zones électives apparaissant comme des bulles claires - Celles-ci sont séparées les unes des autres par des zones chromophiles plus ou moins épaisses et de coloration plus ou moins intense.

- Toutes les extrémités distales des chromatides sont constituées d'une bulle claire.

- La séquence des bandes ainsi formées est caractéristique de chaque paire chromosomique.

- Les centromères sont généralement très colorés.

- Les constrictions secondaires des chromosomes N° 1 et 16 le sont fréquemment; la coloration de celle du chromosome N° 9 est beaucoup plus inconstante.

- Les satellites des chromosomes acrocentriques sont eux aussi très colorés ; leur filament apparait , par contre, comme une bulle claire.

- Le chromosome Y est peu marqué.

- Chez la femme les deux chromosomes X sont de morphologie identique.

3 - Analyse de l'action d'autres enzymes

L'action d'autres enzymes a été étudiée, en reprenant ce protocole, afin de déterminer si l'une d'entre elles pouvait être préférée en raison d'une plus grande commodité d'emploi ou de meilleurs résultats. D'autre part,il était tentant de rechercher si l'on obtenait des résultats différents avec des enzymes agissant spécifiquement en des points différents.

a) Trypsine et α-chymotrypsine :

Nous avons employé :

- La Trypsine Difco 1/250
- L'α-chymotrypsine lyophilisée Choay

La concentration utilisée est 5 mg pour 100 ml.

La solution tamponnée à pH 7,5 identique à celle utilisée pour la protéase.

La solution enzymatique est maintenue à la température du laboratoi

Les résultats sont en tous points comparables à ceux obtenus avec la pronase et la protéase et n'apportent pas de renseignements supplémentaires. Cependant ces enzymes ont, sur la protéase, l'avantage de donner des résultats peut être plus constants, éventuellement en raison de leur plus grande pureté.

b) Pepsine:

Nous avons employé la Pepsine lyophilisée Sigma . Nos différents essais : à 20°, à 37°, en milieu non tamponné, en milieu tamponné à pH 2 par une solution acide chlorhydrique - chlorure de potassium, ne nous ont permis d'obtenir aucun résultat intéressant. Les chromosomes prennent progressivement et lentement (plus de 10 minutes à 37°) un aspect un peu flou sans apparition de marquage .

Cet échec peut être du :

- en milieu non tamponné : à une inactivité de l'enzyme dans un tel milieu - Cependant , cette inactivité ne doit pas être absolue et, en présence d'un grand excès d'enzyme on devrait pouvoir obtenir une action protéolytique, ce que nous n'avons pas observé.

- en milieu tamponné à pH 2 : cet échec peut être du à une apparente "résistance " des protéines chromosomiques en rapport avec une profond modification de celle-ci en pH très acide correspondant à une hydrolyse acide.

c) Papaïne:

Nous avons utilisé la Papaïne présentée cristallisée, en suspension dans une solution à 0,05 M d'acétate de sodium (Sigma)

La solution enzymatique est constituée ainsi :

- Suspension de Papaïne : 0,2 ml
- Eau bidistillée 92 ml
- Solution de tampon phosphate 8 ml

La solution de tampon phosphate est constituée, pour 100 ml,

$Na_2 HPO_4 , 2H_2O$ en solution aqueuse

à raison de 11,876 g/l = 18,5 ml

$KH_2 PO_4$ à raison de 9,078 g/l = 81,5 ml

La solution enzymatique finale a ainsi un pH voisin de 6,4 . Elle est maintenue à la température ordinaire.

On obtient des résultats au bout de temps beaucoup plus longs qu'avec les enzymes précédents ; les marquages (obtenus après 10 minut sont de même type mais de qualité inférieure.

L'activité de l'enzyme peut être augmentée par les donneurs

de groupements SH; nous avons utilisé le Beta Mercapto Ethanol à raison de 0,2 ml pour 100 cc de solution. Néanmoins les résultats ne sont pas suffisamment reproductibles pour que cette technique puisse être utilisée de façon courante.

d) Leucine-amino-peptidase :

Nous avons enfin essayé une exopeptidase spécifique : La Leucine-amino-peptidase. Les préparations chromosomiques n'ont pas été modifiées par cette enzyme.

Une interprétation de ce résultat est possible, connaissant le mode d'action de cette enzyme que nous verrons plus loin.

4 - Comparaison des résultats obtenus par l'action des différentes enzymes

Cette étude de l'action de différentes enzymes protéolytiques montre que quelque soit l'enzyme utilisée, lorsque l'on obtient un marquage celui-ci est toujours le même.

Le choix d'une enzyme doit donc être fait en fonction de sa commodité d'emploi. A ce sujet, la trypsine et l' α-chymotrypsine semblent être des enzymes de choix par la constance de leurs résultats et leur bonne conservation.

Il est apparemment paradoxal d'obtenir des résultats identiques avec des enzymes de modes d'action différents.

- La Pronase n'est pas spécifique.
- La Protéase est active probablement par la forte proportion de trypsine qu'elle contient.
- La Trypsine est une endopeptidase spécifique des liaisons où sont engagés les carboxyles des acides aminés basiques : Lysine et Arginine.
- La chymotrypsine est, elle aussi, une endopeptidase, mais spécifique: des liaisons dans lesquelles sont engagés les carboxyles de la

Tyrosine, de la Phényl-alanine, du Tryptophane, de la Méthionine et de la Leucine.

La pepsine est une endopeptidase spécifique des liaisons dans lesquelles sont engagés les groupements amine des acides aminés aromatiques: Tyrosine, Phényl-alanine et, à un degré moindre des liaisons de Leucine-Valine ou Leucine - acide glutamique.

Il parait donc surprenant d'obtenir une action avec la chymotrypsine et non avec la pepsine ; ceci est peut être du, comme nous l'avons vu, aux conditions particulières d'action de la Pepsine.

La Leucine amino-peptidase est une exopeptidase hydrolysant seulement la liaison peptidique voisine d'une leucine amino-terminale.

Ceci est peut être une explication de son inactivité apparente. Au total , on peut penser que le phénomène de marquage par les enzymes protéolytiques est' lié à la digestion d'une structure protéique sans qu'il soit nécessaire que cette digestion soit due à une attaque de liaisons peptidiques spécifiques.

Il se peut que l'attaque de cette structure protéique se fasse sans digestion totale, mais seulement en des points exposés, entrainant le "décollement" de la liaison polypeptide - ADN. Les modifications structurales alors induites, seraient à l'origine des propriétés tinctinriales.

- - - - - - - - - -

III - COMPARAISON AVEC LES AUTRES TECHNIQUES DE MARQUAGE CHROMOSOMIQUE

- - - - - - - - - - - -

Il reste maintenant à déterminer s'il est possible d'insérer le système de marquage obtenu par cette technique enzymatique dans l'un des 4 systèmes produits par les autres méthodes :

- le système Q (Quinacrine)
- le système C (Centromères)
- le système R (Marquage reverse)
- le système G (Giemsa)

1 - Les différentes techniques

Le système de bandes Q est obtenu par la technique de fluorescence des chromosomes. Celle-ci, découverte par CASPERSSON en 1970 a ouvert la voie aux méthodes de marquage des chromosomes humains.

Son principe est simple : les préparations chromosomiques, hydratées sont traitées, en milieu neutre ou acide par de la moutarde de Quinacrine. L'observation microscopique est faite en lumière ultra-violette.

Dans ces conditions, les chromosomes émettent une fluorescence plus ou moins importante le long des chromatides ; des zones très fluorescentes alternant avec des zones peu fluorescentes. L'étude de ces bandes a montré que leur séquence était caractéristique de chaque paire chromosomique ; le chromosome Y est remarquable en raison d'une fluorescence intense de la partie distale des bras longs.

Les centromères et les constrictions secondaires ne sont en

général pas fluorescents à l'exception des centromères des chromosomes N° 3, 4 et 13, qui sont au contraire souvent très brillants.

Les bandes de type C sont caractérisées par la coloration élective des centromères et des constrictions secondaires.

Dans leur principe supposé, la plupart de ces méthodes, complexes, fait appel à une dénaturation de l'ADN chromosomique suivie d'une renaturation ou d'une hybridation ADN-ARN spécifique, en des points électifs sièges de séquences d'ADN répétitif (ou satellite).

PARDUE et GALL (14) ont utilisé des préparations de culture de tissus de souris. L'ADN chromosomique est d'abord dénaturé par la soude, puis hybridé à de l'ARN radioactif complémentaire d'ADN répétitif. Cet ARN a été préalablement préparé par copie, in vitro, d'ADN satellite de souris,

L'hybridation dure dix heures à 66°.

Les préparations sont ensuite autoradiographiées puis colorées

La radioactivité se concentre assez spécifiquement au niveau des régions centromériques ; celles -ci seraient donc essentiellement constituées d'ADN répétifif.

ARRIGHI et HSU (2) estiment mettre en évidence les mêmes structures sur des cellules humaines (lymphocytes ou fibroblastes).

Cette méthode, très complexe, peut se résumer en une dénaturation de l'ADN par la soude, suivie d'une renaturation dans une solution de citrate de sodium pendant 12 h à 65°. Après coloration, apparaissent presque électivement centromères et constrictions secondaires.

La technique de YUNIS et coll. (22) se rapproche de celle-ci, mais est de réalisation plus simple.

La "dénaturation" s'effectue dans une solution de tampon phosphate à pH 6,8 pendant 10 minutes vers 90°, elle est interrompue

brutalement par refroidissement rapide à 0° . La renaturation a lieu dans la même solution mais à 65° C. Les lames sont ensuite colorées au bout de temps variables. Une coloration après 10 minutes de "renaturation" donne un marquage de type C.

Il convient d'insister sur le caractère très hypothétique du mécanisme invoqué dans ces techniques, mais leur intérêt est d'avoir été à la base des autres méthodes de marquage qui pour la plupart en dérivent par quelques modifications techniques.

La méthode de DUTRILLAUX et LEJEUNE (6) donnant un marquage de type R, dérive de celle de YUNIS et coll.

Les méthodes de "dénaturation" aboutissant à des bandes de type G dérivent de celle d'ARRIGHI et HSU.

- Le système de marquage par bandes R ne peut être obtenu que par une seule technique actuellement, détrite par DUTRILLAUX et LEJEUNE:

Les préparations fixées sont plongées dans une solution de tampon phosphate à pH 6,5 et maintenue à 86° . Elles sont rincées à l'eau courante et colorées au colorant de Giemsa.

Le marquage obtenu est un marquage en contre-type de celui obtenu par la technique de fluorescence des chromosomes, c'est à dire que sont colorées par cette méthode les zones apparaissant non fluorescentes après traitement à la Quinacrine. Pour cette raison ce système a été dénommé R (Reverse). La définition de ce marquage est très satisfaisante et a permis déjà l'analyse de nombreux remaniements chromosomiques. Les chromosomes sont peu altérés par cette technique et, du fait que leurs extrémités distales sont nettement colorées, ils conservent leurs longueurs relatives et leurs indices centromériques.

Par ailleurs, la simplicité et la fidélité de cette technique ont rendu possible leur utilisation de routine depuis plusieurs mois dans le laboratoire.

- Le système de marquage par bandes G est obtenu par un grand nombre de méthodes qui dérivent pour la plupart, comme nous l'avons dit, de la technique d'ARRIGHI et HSU. Nous en énumérerons rapidement les auteurs : SUMNER et coll. (19), SCHNEDL (16), GAGNE et coll. (10), DRETS et SHAW (5).

Ces nombreuses techniques ont pour inconvénient d'être complexes et de donner une moins bonne définition de l'image chromosomique. A l'opposé, une technique très simple décrite par PATIL et coll. (15), consiste en une coloration des préparations en milieu alcalin obtenu par une solution de tampon Mac Ilven à pH 9. Malheureusement, cette technique semble peu fiable.

2 - La technique enzymatique

En tenant compte de cette classification, la disposition des bandes obtenues après technique enzymatique permet de rattacher celle-ci aux techniques de bandes G.

Nous présentons (Fig. 1) un montage montrant un chromosome N° 1 après traitement par la moutarde de Quinacrine, "dénaturation" ménagée de DUTRILLAUX et LEJEUNE et technique enzymatique. On note bien l'aspect en contre-type donné par la "dénaturation" par rapport à la technique de fluorescence et la technique enzymatique.

3 - Nomenclature internationale -

En définitive, les types de marquages caractérisés par la présence d'une succession de bandes sur les chromatides (Q,R,G) peuvent être ramenés à deux : les bandes Q, premier marquage décrit et les bandes R, le second, qui en est la réciproque. Les bandes G, obtenues

Fig. 1 Caryotype féminin normal après digestion enzymatiqu

A droite, comparaison des bandes R (à g.), Q (au centre et G (digest. enzymatique, à d.) du chromosome 1.

par des techniques apparues ensuite peuvent être rattachées, si l'on tient compte de la topographie des points ayant une affinité pour le colorant, aux bandes Q.

Rapidement, est apparue la nécessité d'établir une nomenclature internationale afin d'uniformiser la description du caryotype normal et des remaniements. Les deux systèmes Q (ou G) et R pouvant se déduire l'un de l'autre par réciprocité, il suffisait de décider de l'adoption de l'un d'eux comme système de référence.

La convention internationale de nomenclature réunie à Paris en 1971 a retenu le système Q comme système de référence.

Les bras courts et les bras longs des chromosomes (appelés respectivement p et q) sont divisés en zones par des bandes repères ; celles-ci, qui peuvent être des bandes peu ou très fluorescentes, ont été choisies en fonction de leur netteté et de leur constance de façon que leur reconnaissance soit toujours aisée et non ambigüe.

Les zones délimitées par ces bandes-repères sont numérotées en partant des centromères et en allant vers les extrémités distales. Il a été décrit au plus 4 zones pour un bras chromosomique (bras long du chromosome N° 1).

Les zones sont subdivisées en bandes, numérotées elles-mêmes de la limite proximale de la zone à sa limite distale. Une bande repère constitue la bande N° 1 de la zone distale à laquelle elle est adjacente.

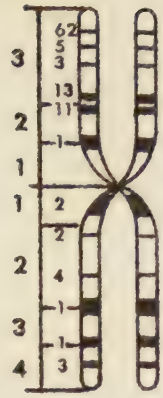
Un point chromosomique est ainsi caractérisé par le bras sur lequel il est localisé (p ou q) suivi du numéro de la zone et enfin du numéro de la bande sur laquelle il est situé; par exemple : p 1 4.

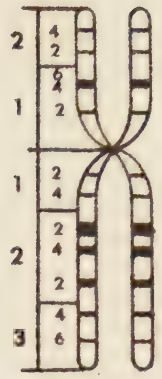
- - - - - - - - - - -

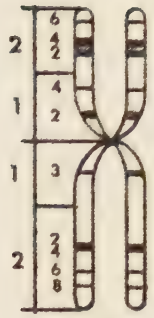
IV - ANALYSE DU CARYOTYPE OBTENU PAR TECHNIQUE ENZYMATIQUE

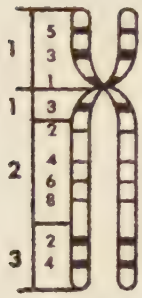
La disposition des bandes que nous avons pu observer après technique enzymatique protéolytique a été représentée schématiquement (fig. 2). Nous y avons répertorié les structures selon la nomenclature internationale. On remarquera qu'à un certain nombre de numéros de bandes définis par la nomenclature, il n'a pas été possible de rattacher une bande correspondante. Ceci provient du fait que la nomenclature a été établie pour définir toutes les bandes qu'il est possible de mettre en évidence par l'ensemble des techniques de marquage.

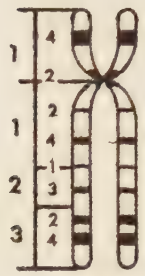
Dans certaines zones, avec cette technique, plusieurs bandes décrites par le nomenclature apparaitront sous forme d'une seule bande.

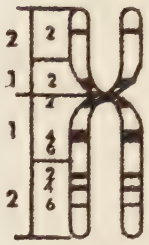

1

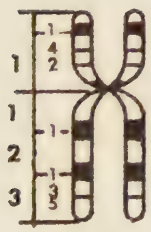

2

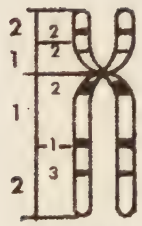

3

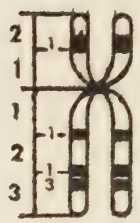

4


5

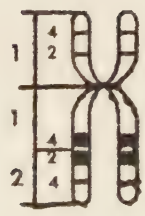

6


7


8


9

10


11

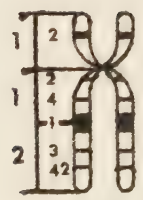
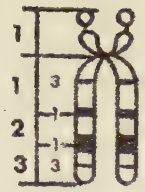

12

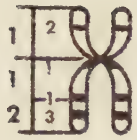
Fig. 2



13

14

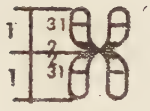
15



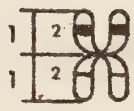
16

17

18

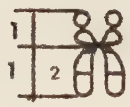


19

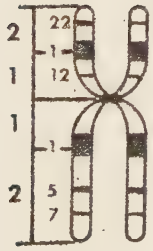


20

21



22

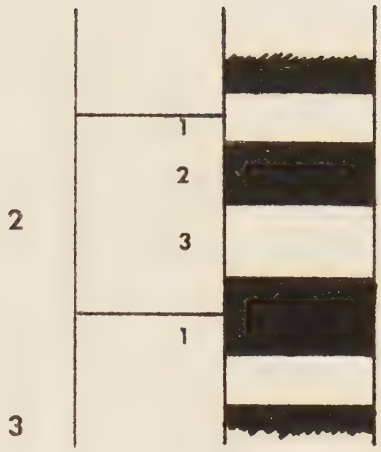


X

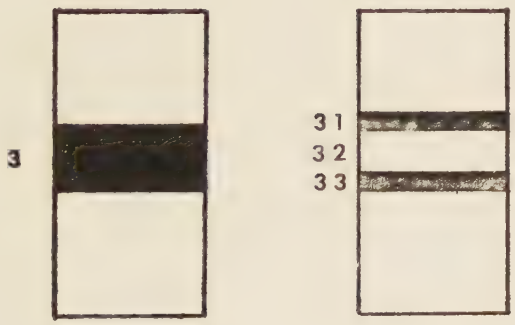
Y

Fig. 2 (suite.)

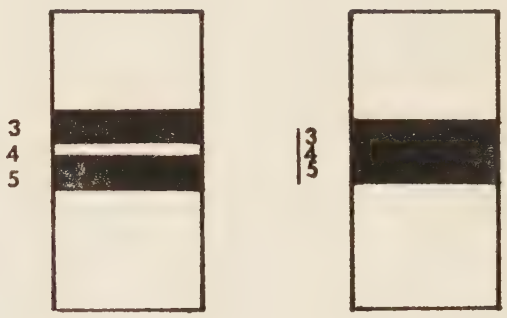
Division en régions



Division d'une région en bandes



Cas d'une bande subdivisée en 3 **sous-bandes** par technique **enzymatique** (à d.)



Cas de 3 bandes non distinguables par technique enzymatique (à d.)

FIG 2 - Légende et Explications

(Sur le schéma général, les bandes sombres ont été seule numérotées)

V - APPLICATION A LA PATHOLOGIE CHROMOSOMIQUE

Afin d'apprécier la valeur de cette technique, nous l'avons appliquée à quelques cas de remaniements chromosomiques.

L'analyse du caryotype pour ces patients n'avait été faite qu'en technique ordinaire pour 1 cas, en technique ordinaire et "dénaturation" pour les 3 autres cas.

Ces observations ont fait ou feront l'objet de publications ; on pourra s'y reporter pour obtenir des précisions cliniques qui ne seront pas détaillées ici.

1 - Etude d'une lacune du bras long du chromosome 2 -

Cette observation (16) concernant un sujet chez qui l'analyse chromosomique en technique ordinaire avait mis en évidence, dans un certain nombre de cellules, une lacune hétérochromatique juxtacentromérique du bras long du chromosome N° 2. Cette lacune est fragile et le fragment distal du bras long peut se perdre . Dans un certain nombre de mitoses la replication de ce fragment est anormale et se produit 2 fois, aboutissant à une endoréduplication sélective.

Il était intéressant d'étudier les chromosomes de ce patient par technique enzymatique afin de savoir si cette région de fragilité possèdait une structure particulière que ne permettaient pas d'observer les colorations ordinaires.

Cette étude a montré que ce point siégait au niveau d'une bande sombre située entre deux bulles claires et qu'il s'agissait bien d'une lacune de tout matériel chromosomique, à l'échelle optique tout au moins (Fig. 3a)

Selon la nomenclature internationale, on peut définir le point de cassure à la bande 2 q 1 4. Nous n'avons malheureusement pas observé d'endoréduplication sélective dans les préparations traitées par cette technique.

2 - Etude d'une translocation G-G

Cette enfant (13) présentait un syndrome typique de trisomie 21.

L'examen du caryotype en technique ordinaire avait montré l'absence de l'un des petits acrocentriques et l'existence en excès d'un grand chromosome acrocentrique ressemblant à un D.

Le syndrome clinique et cet aspect cytologique avaient fait conclure à ce moment à une translocation 21-21 en tandem.

L'examen chromosomique, effectué à nouveau mais par technique enzymatique et "dénaturation" a montré que les deux chromosomes 21 étaient en fait soudés par les extrémités distales de leurs bras longs et qu'il ne s'agissait donc, par conséquent, pas d'une translocation en tandem (Fig. 3d)

La bulle claire distale des bras longs de chacun des chromosomes (21 q 2 2) parait conservée si bien que les cassures semblent s'être produites au niveau des télomères.

Il est à noter que la région centromérique de l'un des éléments transloqués est anormale, probablement en raison d'une petite délétion touchant le centromère lui-même; ce fait a pu être confirmé par des techniques spécifiques de coloration des centromères.

Ces diverses observations permettent de penser que le remaniement est beaucoup plus complexe qu'on ne pouvait le prévoir, puisqu'il résulte probablement de plus de trois cassures.

3 - Etude d'une translocation t (1 ; X)

Cette étude concerne un cas de translocation familiale, recensée à partir d'un homme stérile (9). Il s'agit du premier cas de translocation du chromosome X, reconnu par analyse fine des chromatides (Fig.3b)

L'étude des images obtenues après traitement enzymatique et après "dénaturation" ménagée montre que les points de cassures se situent dans la première bande de la troisième région des bras longs du chromosome 1 (1 q 3.1), et dans la dernière bande de la deuxième région du bras long de l'X (X q 2.8). La formule chromosomique de la patiente est donc, en utilisant cette nomenclature : 46,XX, t (1 ; X) (q 3.1 ; q 2.8)

Ce cas est un exemple de l'intérêt de pouvoir disposer de deux méthodes de marquage, l'une en type, l'autre en contre-type, comme la technique enzymatique et la technique par "dénaturation" ménagée = la bande 1 q 3.1 par exemple, très nette après technique enzymatique , est représentée par une bande claire moins précise après dénaturation ménagée.

4 - Etude d'une translocation t (3; 7)

Il s'agit ici d'une translocation familiale dépistée à partir d'enfants décédés en bas âge et polymalformés (RETHORE M.O. et coll. publication en cours).

L'étude chromosomique par coloration ordinaire avait fait conclure à une translocation réciproque entre un chromosome 3 et un 7 t (3 p- ; 7 q+) ou t (3q- ; 7q+).

L'analyse fine des chromatides, par digestion enzymatique et par "dénaturation" ménagée, montre que cet accident est en fait plus complexe = Le chromosome 3 a subi une délétion intercalaire d'une partie de son bras court à la suite d'une double cassure survenue aux points p 2.1 et p 2.5 (Fig. 3c)

Fig. 3 a) Lacune du bras long du chromosome 2.
à g.= digest.enzymatique, au centre = dénaturation,
à d. = coloration ordinaire.

b,c et d - Respectivement :

translocation t (1 q-; Xq+)

t (3p- ; 7q+)

t (21 ; 21)

à g. = digest. enzymatique, à d. dénaturation

Le chromosome 7, à la suite d'une cassure survenue à la bande q 2.2. a reçu le fragment du chromosome N° 3, en insertion.

Au total, il s'agit donc d'une translocation non réciproque (un seul chromosome ayant subi une perte de matériel génétique), intercalaire, avec inversion du segment inséré dans le chromosome 7.

Il est à noter que dans ce cas la définition donnée par la "dénaturation" est nettement supérieure à celle donnée par la technique enzymatique.

Cette anomalie est le premier exemple de translocation intercalaire décrit dans l'espèce humaine.

5 - Comparaison des résultats obtenus par la technique de digestion enzymatique et par la technique de dénaturation.

Après avoir appliqué cette technique sur un certain nombre de cas, il nous est apparu qu'elle possèdait son intérêt propre dans certains cas particuliers : lacunes "hétérochromatiques", remaniements portant sur des zones particulièrement bien marquées (translocation 1 X par exemple).

Mais, elle conserve de gros inconvénients :

Dans sa pratique :

- elle ne peut être facilement codifiée, les temps de contact nécessaires avec l'enzyme étant variables avec chaque préparation.

Mais surtout dans ses résultats :

- elle altère beaucoup le contour des chromosomes, modifiant, par le gonflement des bandes claires, leurs longueurs relatives et leurs indices centromériques. Ces modifications sont d'autant plus sensibles que la taille de l'élément est plus petite.

- par ailleurs, le marquage est parfois infidèle : une même bande sombre pouvant, après action enzymatique plus prolongée comme nous l'avons vu, se subdiviser en deux bandes sombres plus fine enserrant une bande claire; à ce stade le chromosome est souvent déjà très altéré.

La difficulté de l'emploi des enzymes protéolytiques provient donc du fait que la marge entre un marquage chromosomique de bonne définition et le début des altérations de la structure du chromosome est très faible. Pour une même mitose, on peut souvent observer des chromosomes déjà altérés, alors que d'autres sont encore insuffisamment marqu'és.

- - - - - - - - -

VI - INTERET THEORIQUE DE LA METHODE

- - - - - - - - - - - - - - - -

Ainsi, l'apport des résultats de la technique de digestion enzymatique des chromosomes apparait être essentiellement théorique.

On sait depuis longtemps que les chromosomes sont composés d'acides nucléiques et de protéines, cependant, même les techniques les plus avancées comme la microscopie électronique, ne permettent pas d'en connaitre la structure fine. En particulier, l'agencement des différents constituants à l'intérieur des chromatides reste mal connu.

La découverte des propriétés chimiques de l'ADN comme la dénaturation, la renaturation et l'hybridation fut à l'origine de nombreuses expériences. Certaines d'entre elles ayant révélé une structure hétérogène des chromatides, leurs auteurs pensèrent que ces phénomènes réflétaient directement des propriétés de l'ADN chromosomique (ADN répétitif par exemple). A l'encontre de ces théories , un certain nombres d'observations faites au laboratoire laissent à penser que les modifications subies par le chromosome sont peut être plus complexes (8).

En particulier, comme l'a montré la technique de digestion par les enzymes protéolytiques, le marquage chromosomique dépend, partiellement au moins de la composition proétique du chromosome, ou même des substances nucleoplasmiques qui l'entourent. Cette action élective sur les protéines est partiellement confirmée par les résultats donnés par l'action d'enzymes détruisant spécifiquement les acides nucléiques (DNase, RNase), qui n'ont , jusqu'alors , jamais révélé de structure particulière sur les chromosomes. Cette hétérogeneité de structure des

chromosomes, mise en évidence par les différentes techniques est-elle préexistante à tout traitement ? C'est ce que laissent supposer les observations en technique de fluorescence, où la moutarde de Quinacrine, sans aucun traitement préalable, se fixe sélectivement en certains points du chromosome. Cette différence d'affinité pour le colorant le long des chromatides est suffisamment grande lorsque l'on utilise les dérivés de la Quinacrine pour être révélée spontanément. Au contraire, lorsque l'on utilise un colorant habituel, tel que le Giemsa, cette différence d'affinité peut être spontanément trop faible et ne pas apparaître. Pour obtenir une coloration sélective, un traitement antérieur ou simultané des préparations à la coloration,est nécessaire.

La comparaison des résultats obtenus avec l'ensemble des techniques montre que la topographie des bandes correspond toujours à une même séquence, on peut donc émettre deux hypothèses :

- ou bien des techniques agissent toutes uniquement en détruisant des protéines -
- ou bien certaines seulement agissent ainsi (ce qui est très probablement le cas de la technique expérimentée ici), alors que d'autres agissent sur un autre constituant du chromosome, sur l'ADN en particulier.

Un marquage identique, obtenu par un agant protéolytique ou par un agent dénaturant de l'ADN, pourrait s'expliquer par une attaque dans l'un et l'autre cas, d'un segment chromosomique où les relations ADN - Protéines sont telles que la destruction de l'une ou de l'autre de ces molécules entraine une modification locale de l'architecture chromosomique et par conséquent, des propriétés tinctoriales.

De très nombreux travaux s'orientent vers la connaissance des mécanismes d'action des techniques de marquage chromosomique.

Leurs résultats permettront de confirmer ou d'infirmer les hypothèses actuelles et d'élucider la structure chromosomique.

CONCLUSION

Selon la méthode utilisée : traitement par les enzymes protéolytiques d'une part, observation en lumière ultra-violette après coloration par des dérivés de la quinacrine, dénaturation par la chaleur en milieu légèrement acide et autres méthodes de dénaturation d'autre part, un même segment chromosomique apparait soit fortement, soit flaiblement coloré; la séquence des bandes ainsi révélées est cependant toujours identique. Ceci laisse supposer que ces différentes méthodes révèlent différents aspects d'une même structure.

Parmi toutes ces méthodes, une semble prévaloir : la technique de dénaturation par la chaleur en milieu acide, dont la régularité des résultats permet une utilisation systématique, parallèlement à la technique classique. Par ailleurs elle n'entraine pas d'altération importante des chromosomes et colore leurs extrémités distales, ne modifiant ainsi ni leurs longueurs relatives ni leurs indices centromériques.

La technique par digestion enzymatique protéolytique apparait comme le complément de la méthode de dénaturation; son intérêt pratique est particulièrement évident dans certains cas de remaniements chromosomiques en raison de l'aspect en contre-type des structures qu'elle révèle.

Son intérêt théorique est au moins aussi grand puisqu'elle a été la première technique permettant de montrer que les phénomènes de marquage des chromosomes ne résultaient pas exclusivement de la composition locale de leur A D N mais aussi de celle de leurs constituants protéiques.

BIBLIOGRAPHIE

1 - AL-AISH M.S. - Pronase effects on chromosome structure in vitro. 4ème Congrès international Génétique Humaine - Paris 1971 Excerpta Médica ICS 233,14

2 - ARRIGHI F.E. et HSU T.C. - Localization of heterochromatin in human chromosomes - Cytogenetics 10, 81-86 - 1971

3 - CASPERSSON T., ZECH L., JOHANSSON C. - Analysis of human metaphase chromosome set by aid of DNA-binding fluorescent agents. Exp. Cell. Res. 62, 490-492 - 1970

4 - CASPERSSON T., LOMAKKA G. et ZECH L. - The 24 fluorescence patterns of the human metaphase chromosomes - distinguishing characters and variability - Hereditas (Lund) 67, 89-102 - 1971

5 - DRETS M.E. et SHAW M.W. - Specific banding patterns of human chromosomes - Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 68, 2037 - 1971

6 - DUTRILLAUX B. et LEJEUNE J. - Sur une nouvelle technique d'analyse du caryotype humain. C.R. Acad. Sci. (Paris), 272, 2638-2640 - 1971

7 - DUTRILLAUX B., GROUCHY J. de, FINAZ C., et LEJEUNE J. Mise en évidence de la structure fine des chromosomes humains par digestion enzymatique (Pronase en particulier) C.R. Acad. Sci.(Paris) 273, 587-588 - 1971

8 - DUTRILLAUX B., FINAZ C., GROUCHY J. de , et LEJEUNE J. - Comparison of banding patterns of human chromosomes obtained with heating, fluorescence and proteolytic digestion Cytogenetics 11, 113-116 - 1972

9 - DUTRILLAUX B., COUTURIER J., ROTMAN J., SALAT J. et LEJEUNE J. - Stérilité et translocation familiale t (1q- ; Xq+) (en cours de publication)

10 - FINAZ C. et GROUCHY J. de - Le caryotype humain après traitement par l'α-chymotrypsine - Ann. Genet. 14, 309-311 - 1971

11 - GAGNE R., TANGAY R. et LABERGE C. - Differential staining patterns of heterochromatin in man - Nature - (Lond) New Biology 232 , 29 - 1971

12 - GROUCHY J; de , ROUBIN M., et BILLARDON C. - Etudes chromosomiques à partir de cultures cellulaires - Modifications techniques - Ann. Genet. 13, 141 - 1970

13 - LEJEUNE J., BERGER R., VIDAL O.R. et RETHORE M.O. -
Un cas de translocation G-G en tandem -
Ann. Genet. 8, 60-62 - 1965

14 - PARDUE M.L. et GALL J.G. - Chromosomal localization of mouse satellite DNA -
Science 168 - 1356-1358 - 1970

15 - PATIL S.R. ,MERRICK S. et LUBS H.A. - Identification of each human chromosome with a modified Giemsa stain.
Science 173, 821-822 - 1971

16 - QUACK B., NANTOIS Y., NOEL B. - Lacune juxtacentromérique et endoréduplication sélective.
4ème Congrès international Génétique humaine - Paris 1971
Excerpta Médica ICS 233 - 147

17 - SCHNEDL W. - Analysis of the human caryotype using a reassociation technique -
Chromosoma (Berl) 34, 448-454 - 1971

18 - SEABRIGHT M.A. - Rapid banding technique for human chromosomes
Lancet Vol. II, 971-972 - 1971

19 - SEABRIGHT M - The use of proteblytic enzymes for the mapping of structural rearrangements in the chromosomes of man.
Chromosoma (Berl.) 36 - 204-210 - 1972

20 - SUMNER A.T., EVANS H.J. et BERCKLAND R.A. - New technique for distinguishing between human chromosomes.
Nature (Lond.) New Biology - 232 - 27 - 1971

21 - TURPIN R. et LEJEUNE J. - Les chromosomes humains -
Gauthier Villars - p. 23-29 - 1965

22 - YUNIS J.J., ROLDAN L., YASMINCH W.G. et LEE J.C. -
Staining of satellite DNA in metaphase chromosomes.
Nature (Lond.) 231, 532-533 - 1971

Vu le Président de Thèse

Pr. J. LEJEUNE

Vu le Doyen de la Faculté

Pr. H. JEROME

Vu et permis d'imprimer
Le Recteur de l'Académie de Paris

R. MALLET